



УДК 579.222:547.864+579.841.11

И.Н. ФЕКЛИСТОВА, Н.П. МАКСИМОВА

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА ФЕНАЗИНА БАКТЕРИЯМИ *PSEUDOMONAS AURANTIACA* B-162

We have established that optimum condition for phenazine production in bacteria *P. aurantiaca* B-162 is temperature 30 °C, pH 7,2 and cultivation during 4 days. Synthesis of pigment was stimulated by fructose, glucose, glycerin, arabinose, mannose and sucrose.  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$  ions induced the antibiotic formation, while  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  inhibited its biosynthesis.

Известно, что представители рода *Pseudomonas* образуют различные анти-микробные соединения широкого спектра действия. Синтез антибиотиков лежит в основе способности этих бактерий подавлять рост и развитие фитопатогенных микроорганизмов и нематоды, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных объектов агробιοтехнологии - основы биопрепаратов для защиты растений.

Ранее с использованием ПЦР-анализа в составе генома ризосферных бактерий *Pseudomonas aurantiaca* B-162 нами были обнаружены гены, контролирующие синтез феназиновых пигментов [1]. Известно, что бактерии *Pseudomonas* могут синтезировать несколько типов феназиновых соединений, высокоактивных в отношении ряда фитопатогенных организмов [2, 3]. При этом продукция данных антибиотиков в значительной степени зависит от условий культивирования конкретно взятого штамма.

Детальный анализ феназинового комплекса бактерий *P. aurantiaca* B-162 с помощью HPLC позволил идентифицировать в его составе два компонента - феназин (основной) и феназин-1,6-дикарбоксилат (минорный). Цели данной работы - оптимизация условий, обеспечивающих максимальную продукцию феназина бактериями *P. aurantiaca* B-162, а также изучение влияния ряда органических и неорганических соединений на синтез антибиотика.

### Материал и методика

Штамм *P. aurantiaca* B-162 получен из коллекции кафедры генетики БГУ (коллекционный номер ВКМВ-162). Бактерии выращивали без аэрации в среде (pH 7,2), содержащей Difco пептон (0,2 %), NaCl (1 %),  $\text{KNO}_3$  (0,1 %) и глицерин (1 %) [4]. В отдельных экспериментах в качестве источника углерода вместо глицерина использовали глюкозу, сахарозу, лактозу, арабинозу, маннозу, мальтозу, манит, этанол, серин, цитрат, антранилат, фруктозу, триптофан, п-оксибензоат, л-аминобензоат, малонат и сукцинат (1 %). Выделение феназина осуществляли по схеме, предложенной в работе [4].

### Результаты и их обсуждение

В серии предварительных экспериментов были подобраны условия, обеспечивающие максимальный уровень синтеза феназина бактериями *P. aurantiaca* B-162, - длительность культивирования, температурный оптимум, pH среды. В ходе экспериментов было выявлено, что максимальная концентрация феназина в среде регистрируется на 4-е сут выращивания бактерий, что характерно для

вторичных метаболитов и соответствует данным различных исследователей [4, 5]. Очевидно, что к концу 3-х сут в культуральной среде накапливается достаточное количество сигнальных молекул N-ацилгомосеринлактона, связывание которых с регуляторным белком PhzR приводит к активации транскрипции *phz*-генов [6]. Оптимум температуры (f) выращивания изучаемых бактерий составил 30 °С (рис. 1 а), значение pH среды - 7,2 (см. рис. 1 б). Содержание феназина в культуральной жидкости при указанных условиях достигало 33-36 мг/л. Другие известные представители рода *Pseudomonas* обладают меньшей продукционной способностью: бактерии *P. chlororaphis* синтезируют 18,1 мг/л феназин-1-карбоксилата и 1 мг/л феназин-1-карбоксиамида, *P. aeruginosa* Mac436 - 4,6 мг/л оксихпорорафина и 15,6 мг/л феназин-1-карбоксилата, а *P. phenazinium* - 10,5 мг/л феназин-1-карбоксилата и 7,5 мг/л 1,8-диоксифеназин-10-монооксида [4, 7, 8].

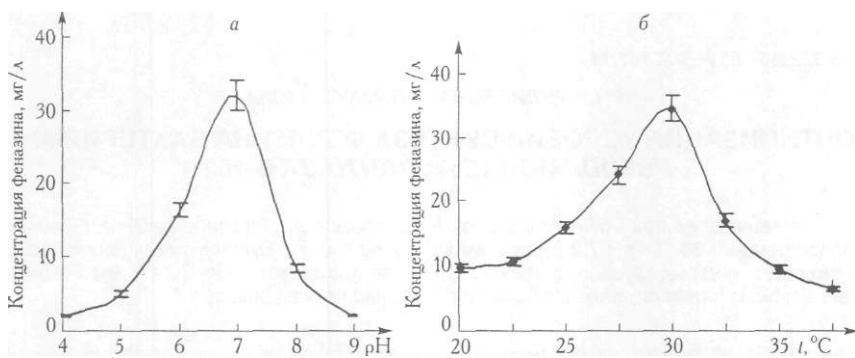


Рис. 1. Зависимость уровня синтеза феназина от pH среды (а) и температуры выращивания (б) бактерий *P. aurantiaca* B-162

Предпочтительными источниками углерода для образования феназинов исследуемыми бактериями являются сахароза, глюкоза, арабиноза, глицерин, манноза и фруктоза, при добавлении которых в ростовую среду содержание феназина достигало 18-36 мг/л (рис. 2). Низкий уровень продукции пигмента (5-10 мг/л) наблюдается при использовании таких источников углерода, как лактоза, мальтоза, манит, триптофан, серин и антранилат, а при введении в среду этанола, цитрата, сукцината, также л-амино- и л-оксибензоата концентрация феназина в культуральной жидкости составляла менее 1 мг/л. Необходимо отметить, что бактерии *P. aurantiaca* B-162 способны использовать все указанные соединения в качестве источника углерода и энергии.

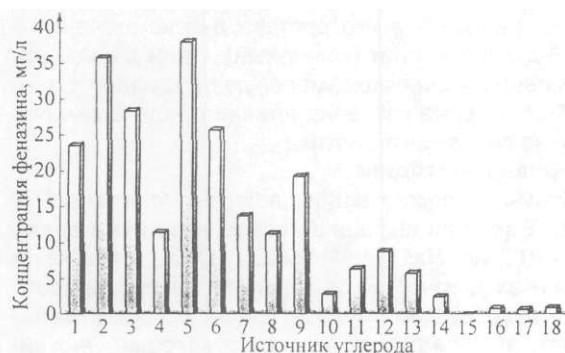


Рис. 2. Образование феназина бактериями *P. aurantiaca* B-162 при росте на различных источниках углерода:

1 – сахароза; 2 – глюкоза; 3 – фруктоза; 4 – лактоза; 5 – арабиноза; 6 – манноза; 7 – мальтоза; 8 – манит; 9 – глицерин; 10 – этанол; 11 – триптофан; 12 – антранилат; 13 – серин; 14 – цитрат; 15 – малонат; 16 – сукцинат; 17 – аминокислота; 18 – оксикислота

Негативное влияние триптофана на выход феназина у бактерий изучаемого штамма можно объяснить его ингибирующим действием по отношению к ключевому ферменту ароматического пути - ДАГФ-синтазе. Ранее нами было показано, что у данного штамма триптофан вызывает аллостерическое ингибирование названного фермента и соответственно снижение уровня хоризмата, являющегося предшественником феназинов [9]. Низкий уровень продукции изучаемого антибиотика бактериями *P. aurantiaca* B-162 при росте в среде с антранилом позволяет сделать вывод о том, что данное соединение не является предшественником феназиновых пигментов, как считалось ранее.

Зависимость синтеза феназиновых пигментов от источника углерода, в частности, аминокислот и метаболитов цикла Кребса, ранее была показана для *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* и *P. putida*: уровень образования антибиотиков увеличивался при внесении глицерина, глюкозы и п-аминобензоата [4, 10] и подавлялся ароматическими аминокислотами [11].

На биосинтез феназина бактериями *P. aurantiaca* B-162 оказывают влияние также неорганические ионы. Результаты экспериментов показали, что добавление ионов  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$  в ростовую среду (конечная концентрация 1 мМ) приводит к повышению содержания феназина в культуральной среде в 1,2-1,3 раза, тогда как  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  вызывают снижение уровня продукции на 20-40 % (рис. 3). Ранее нами было установлено, что ионы  $\text{Fe}^{2+}$  концентрации 10 мМ в 1,2 раза увеличивают уровень активности ФЕП-синтазы, являющейся поставщиком субстрата для ДАГФ-синтазной реакции, а  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ -ионы в концентрации 1,5 мМ повышают активность самой ДАГФ-синтазы в 3,5 и 1,3 раза соответственно [12], что приводит к увеличению синтеза хориозмата и, как следствие, продукции феназина.

Известно, что высокие концентрации фосфатов стимулируют синтез феназинового пигмента пиоцианина у *P. aeruginosa*, но не влияют на уровень продукции антибиотиков у бактерий *P. phenazinum* [10, 13, 14]. Повышение синтеза поликетидных антибиотиков (2,4-диацетилфлороглюцинола и пиолитеорина) при добавлении ионов  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Mo}^{2+}$  было описано ранее для *P. fluorescens* [13].

Таким образом, в результате проведенных исследований оптимизированы условия синтеза феназина бактериями *P. aurantiaca* B-162. Максимальная продукция феназина у изучаемых бактерий наблюдается при культивировании их в течение 4 сут при температуре среды 30 °C и pH 7,2. Предпочтительными источниками углерода и энергии для образования феназина являются сахара, глюкоза, арабиноза, глицерин, манноза или фруктоза; синтез антибиотика стимулируется ионами  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ .

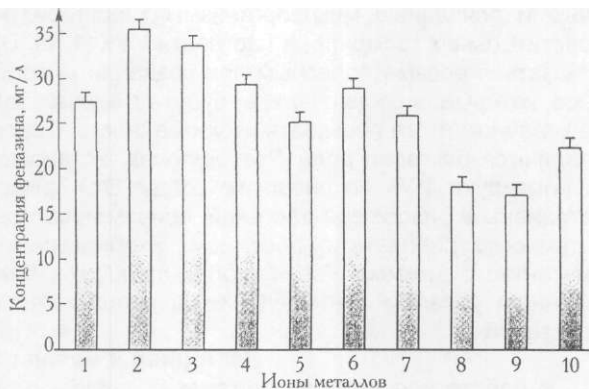


Рис. 3. Влияние ионов металлов на продукцию феназина бактериями *P. aurantiaca* B-162:  
1 – без добавления ионов металлов; 2 –  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ; 3 –  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 4 –  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 5 –  $\text{CaCl}_2$ ; 6 –  $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 7 –  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ; 8 –  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 9 –  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ; 10 –  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

1. Феклистова И.Н., Максимова Н.П. // Вестн. Белорус. гос. ун-та. 2005. № 2. С. 66.
2. Haas D., Keel C. // Annu. Rev. Phytopathol. 2003. Vol. 41. P. 117.
3. Mavrodi D. et al. // J. Bacteriol. 1998. Vol. 180. P. 2541.
4. Levitch M.E., Stadman E.R. // Arch. Biochem. Biophys. 1964. Vol. 106. P. 194.
5. Mavrodi D.V. et al. // J. Bacteriol. 2001. Vol. 183. P. 6454.
6. Fuqua W., Winans S., Greenberg E. // J. Bacteriol. 1994. Vol. 176. P. 269.
7. Chang P.C., Blackwood A. C. // Can. J. Microbiol. 1969. Vol. 15. P. 439.
8. Ge Y. et al. // FEMS Microbiol. Lett. 2004. Vol. 237. P. 41.
9. Феклистова И.Н., Максимова Н.П. // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. М., 2004. С. 165.
10. Messenger A. J., Turner J. // J. Gen. Microbiol. 1983. Vol. 123. P. 1013.
11. Byng G., Eustice D., Jensen R. // J. Bacteriol. 1979. Vol. 138. P. 846.
12. Феклистова И.Н., Максимова Н.П. // Вестн. Белорус. гос. ун-та. 2004. № 3. С. 48.
13. Duffy B., Defago G. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65. P. 2429.
14. Ingledew W., Campbell J. // Can. J. Microbiol. 1969. Vol. 15. P. 595.

Поступила в редакцию 02.03.05.

**Ирина Николаевна Феклистова** - аспирант кафедры генетики. Научный руководитель - Н.П. Максимова.

**Наталья Павловна Максимова** - кандидат биологических наук, доцент, заведующая кафедрой генетики.